

论著·临床研究

双胎新生儿枫糖尿病及其基因突变分析

李涛 王瑜 李粹 徐玮玮 牛峰海 张娣

(济宁医学院附属医院儿科, 山东 济宁 272000)

[摘要] **目的** 分析一对经典型枫糖尿病(MSUD)汉族双胎新生儿的临床特点及其相关基因的致病性突变,为MSUD早期诊治提供指导。**方法** 收集患儿的临床及影像学资料,提取患儿及其父母的外周血,检测枫糖尿病相关基因(BCKDHA, BCKDHB, DBT, DLD),确定基因突变位点,并进行生物信息学分析。**结果** 双胎患儿在BCKDHB基因上发现2个突变:错义突变c.304G>A(p.Gly102Arg)和无义突变c.331C>T(p.Arg111*),均为杂合子,且c.304G>A(p.Gly102Arg)为国际上未报道的新突变。其父亲携带错义突变c.304G>A(p.Gly102Arg),其母亲携带无义突变c.331C>T(p.Arg111*)。**结论** BCKDHB基因c.331C>T(p.Arg111*)杂合突变是该双胎患儿的致病性突变,是枫糖尿病患儿临床表现的基因分子基础。

[中国当代儿科杂志, 2016, 18(12): 1242-1246]

[关键词] 枫糖尿病; 双胎; 基因突变; 新生儿

Maple syrup urine disease and gene mutations in twin neonates

LI Tao, WANG Yu, LI Cui, XU Wei-Wei, NIU Feng-Hai, ZHANG Di. Department of Pediatrics, Affiliated Hospital of Jining Medical University, Jining, Shandong 272000, China (Email: jyfylitao@163.com)

Abstract: Objective To investigate the clinical features of one pair of twin neonates with maple syrup urine disease (MSUD) in the Chinese Han population and pathogenic mutations in related genes, and to provide guidance for the early diagnosis and treatment of MSUD. **Methods** The clinical and imaging data of the twin neonates were collected. The peripheral blood samples were collected from the twin neonates and their parents to detect the genes related to MSUD (BCKDHA, BCKDHB, DBT, and DLD). The loci with gene mutations were identified, and a bioinformatic analysis was performed. **Results** Two mutations were detected in the BCKDHB gene, missense mutation c.304G>A (p.Gly102Arg) and nonsense mutation c.331C>T (p.Arg111*), and both of them were heterozygotes. The mutation c.304G>A (p.Gly102Arg) had not been reported in the world. Their father carried the missense mutation c.304G>A (p.Gly102Arg), and their mother carried the nonsense mutation c.331C>T (p.Arg111*). **Conclusions** The c.331C>T (p.Arg111*) heterozygous mutation in BCKDHB gene is the pathogenic mutation in these twin neonates and provides a genetic and molecular basis for the clinical features of children with MSUD.

[Chin J Contemp Pediatr, 2016, 18(12): 1242-1246]

Key words: Maple syrup urine disease; Twin pregnancy; Gene mutation; Neonate

枫糖尿病(maple syrup urine disease, MSUD)为氨基酸代谢病的一种,又称支链酮酸尿症,是由于催化亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸的支链 α -酮酸脱氢酶(branched chain α -ketoacid dehydrogenase, BCKDH)复合体功能缺陷,使得支链氨基酸(branched chain amino acids, BCAA)转氨形成的相应支链 α -酮酸(branched chain

α -ketoacid, BCKA)不能进行氧化脱羧,导致体内的BCAA和BCKA异常增高。BCAA如亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸大量蓄积对脑组织产生神经毒性作用,导致脑白质病变;而BCKA可从尿及体液中排出,因而出现类似枫糖浆的气味。MSUD于1954年由Menkes等^[1]最早报道,国外统计其发病率为1/12万~1/50万不等^[2],国内相关报道不多^[3],

[收稿日期] 2016-07-20; [接受日期] 2016-09-12

[作者简介] 李涛,男,硕士,主治医师。

[通信作者] 王瑜,女,主任医师。

特别是双胞胎同时发病者未见报道。本研究对枫糖尿症双胞胎新生儿的临床资料进行分析,并对患儿及其父母进行相关基因测序分析,寻找发病的分子遗传学证据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

病例 1: 患儿,女,汉族,8 d, 双胞胎之大,因腹胀、拒乳 1 d 入院。患儿为第 3 胎第 2 产,胎龄 37⁺₄ 周,剖宫产出生,出生体重 2800 g,出生无窒息史,脐带、羊水、胎盘无异常。生后 2 h 开始配方奶喂养。

父母亲均 24 岁,农民,非近亲婚配,身体健康。

体格检查: T 36.5℃, P 128 次/min, R 38 次/min, 体重 2740 g。足月新生儿貌,刺激反应差。颜面部、躯干部皮肤轻微黄染,前囟平软。心肺听诊无异常。腹膨隆,肝肋下 2.0 cm、剑突下 2.0 cm,质软,肠鸣音 4 次/min,四肢肌张力高,吸吮反射、觅食反射、拥抱反射减弱。

辅助检查: 血常规 WBC $24.5 \times 10^9/L$ (正常值:

$10 \sim 15 \times 10^9/L$)、淋巴细胞比率 35.5%、中性粒细胞比率 58.9%, HGB 180 g/L (正常值: 145~220 g/L)、PLT $326 \times 10^9/L$ (正常值: $125 \sim 350 \times 10^9/L$)。尿常规: 酮体 2+、pH 6.0。粪常规正常。肝肾功能、心肌酶、血糖及电解质均正常,血气分析提示代偿性代谢性酸中毒。脑脊液检查正常。血酮体 5.20 mg/dL (正常值: 0~3.12 mg/dL)。X 片提示肺炎,肠腔积气、扩张。头部 MRI: 双侧小脑半球齿状核、脑干、基底节区及双侧放射冠至皮质区对称性异常信号: 代谢性脑病可能性大 (图 1A~C)。入院第 2 天采血行串联质谱检测,显示亮氨酸为 3471 μmol/L (正常值: <375 μmol/L)、缬氨酸 561 μmol/L (正常值: <325 μmol/L)。

治疗经过: 入院后予配方奶喂养、控制感染,第 2 天出现反复抽搐,呼吸浅慢,尿液有枫糖浆气味,予苯巴比妥钠镇静,甘露醇降颅压,神经节苷脂营养脑细胞等治疗;结合血串联质谱检测结果,入院第 3 天临床诊断为枫糖尿症,予去除 BCAA 的特殊配方奶粉喂养及维生素 B₁ 口服,病情无改善;入院第 5 天患儿家长要求放弃治疗,出院后死亡。

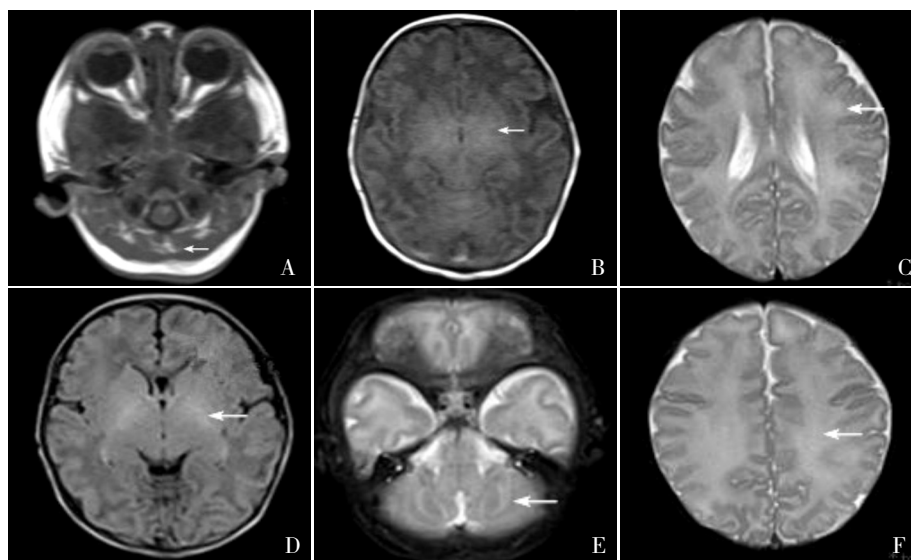


图 1 双胞胎患儿头部 MRI 图 1A~C: 双胞胎之大第 9 天头部 MRI。双侧小脑半球齿状核 (图 1A)、基底节区 (图 1B)、双侧放射冠至皮质区 (图 1C) 对称性片状等 T1、略长 T2 异常信号 (箭头所示), 边缘模糊。图 1D~F: 双胞胎之小第 10 天头部 MRI。基底节丘脑 (图 1D)、双小脑半球 (图 1E)、放射冠 (图 1F) 对称性片状长 T1 低信号、长 T2 高信号 (箭头所示)。

病例 2: 患儿,男,8 d,因拒乳、发热 5 h 入院。患儿为第 3 胎第 2 产,胎龄 37⁺₄ 周剖宫产出生,系双胞胎之小,出生体重 2130 g,生后无窒息史,

脐带、羊水、胎盘无异常。患儿生后 2 h 开始配方奶喂养,入院前 5 h 出现拒乳、嗜睡、发热。体格检查: T 37.4℃, P 130 次/min, R 42 次/min, 体

重 2300 g。足月新生儿貌，刺激反应差，颜面部、躯干部皮肤轻微黄染，前囟平软。心肺听诊无异常。腹略膨隆，肝肋下 1.5 cm、质软，肠鸣音 5 次/min。肌张力可，吸吮反射、觅食反射、拥抱反射减弱。

辅助检查：血常规正常。尿常规：酮体 3+、pH 6.0。粪常规正常。肝肾功能、心肌酶、血糖及电解质均正常。血碳酸氢盐 10.5 mmol/L（正常值：22~27 mmol/L），提示代谢性酸中毒。血酮体 9.5 mg/dL（正常值：0~3.12 mg/dL）；血氨 69 μ mol/L（正常值：9~33 μ mol/L）。头部 MRI：双侧半卵圆中心、放射冠、基底节、丘脑、脑干及双小脑半球对称性异常信号，考虑代谢性疾病（图 1D~F）。入院第 2 天采血行串联质谱检测，显示亮氨酸 2 971.6 μ mol/L（正常值：<375 μ mol/L）、缬氨酸 500 μ mol/L（正常值 <325 μ mol/L），均显著升高。

治疗经过：入院后予配方奶喂养及控制感染、补液等对症支持等治疗，第 2 天体温正常并发现尿液有枫糖浆气味；结合血串联质谱检测结果，于第 3 天临床诊断为枫糖尿病，给予去除 BCAA 的特殊配方奶粉喂养及维生素 B₁ 口服，病情无改善；入院第 5 天患儿家长要求放弃治疗，出院后患儿死亡。

追问病史：家系第 1 胎，男，生后 7 d 因拒乳、呕吐、嗜睡、惊厥于当地医院住院，生后 13 d 死亡；血串联质谱检测显示：亮氨酸 3 478 μ mol/L（正常值：<375 μ mol/L）、缬氨酸 600 μ mol/L（正常值：<325 μ mol/L），均显著升高，支持枫糖尿病。家系第 2 胎于母亲妊娠早期流产。

1.2 基因组 DNA 提取

取得患儿父母知情同意，采集双胞胎患儿及其父母外周血各 2 mL，乙二胺四乙酸（EDTA）抗凝，采用 Gentra Puregene Blood Kit（Qiagen 公司生产）提取基因组 DNA，提取后使用 Nanodrop 2000 蛋白核酸分析仪检测 DNA 浓度及纯度，确保 DNA 总量大于 2 500 ng，A260/A280 在 1.8~2.0 再进行后续实验。

1.3 分子遗传学检测

进行枫糖尿病相关基因（BCKDHA，BCKDHB，DBT，DLD）的外显子编码区直接基因测序，并与参考序列做对比。4 个基因参考序列分别为 BCKDHA：NM_000709.3 与 NC_000019.9；

BCKDHB：NM_000056.3 与 NC_000006.11；DBT：NM_001918.2 与 NC_000001.10；DLD：NG_008045.1 与 NM_000108.4。

2 结果

基因测序结果显示，双胞胎患儿在 BCKDHB 基因均发现 2 个突变：错义突变 c.304G>A（p.Gly102Arg）和无义突变 c.331C>T（p.Arg111*），均为杂合子，且 c.304G>A（p.Gly102Arg）为国际上未报道过的新突变，在 ESP6500、dbSNP、千人基因组数据库和 HGMD 数据库里均未见报道；而在 BCKDHA，DBT 和 DLD 基因的编码区未发现突变。对患儿父母的样本进行 BCKDHB 基因的 c.304G、c.331C 位点测序，发现患儿父亲携带了错义突变 c.304G>A（p.Gly102Arg），患儿母亲携带了无义突变 c.331C>T（p.Arg111*），均为杂合突变。见图 2。

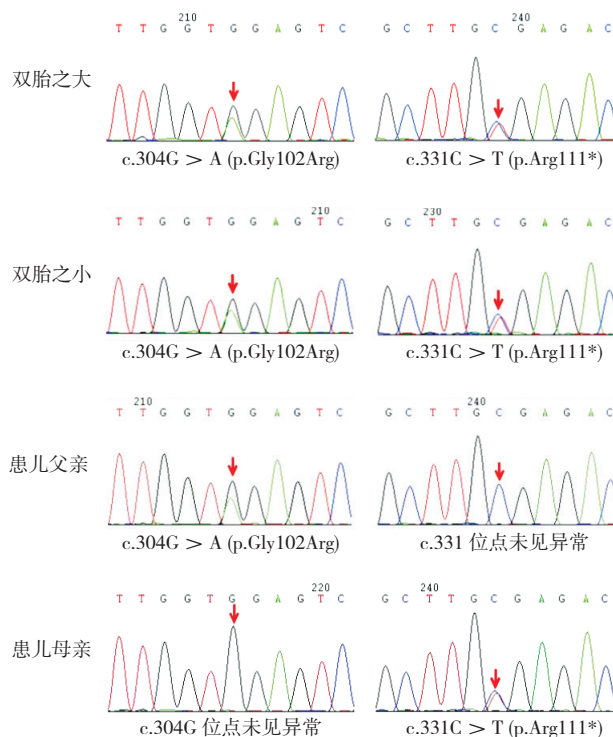


图 2 双胞胎患儿及其父母基因测序结果 双胞胎患儿在 BCKDHB 基因发现错义突变 c.304G>A（p.Gly102Arg）和无义突变 c.331C>T（p.Arg111*）；患儿父亲在 BCKDHB 基因发现错义突变 c.304G>A（p.Gly102Arg），患儿母亲在 BCKDHB 基因发现无义突变 c.331C>T（p.Arg111*）。箭头示突变位点。

3 讨论

MSUD 是一种相对少见的氨基酸代谢病, 主要分 5 型: 经典型 (新生儿型)、中间型、间歇型、维生素 B₁ 反应型、二氢脂酰脱氢酶缺乏型。新生儿期发病者常为经典型, 患儿出生时大都正常, 生后 12~24 h 出现尿液或汗液枫糖浆味, 2~3 d 出现酮兴奋和哺乳困难, 4~5 d 出现嗜睡、角弓反张、惊厥等脑病表现, 如未得到及时治疗可于 7~10 d 出现昏迷、中枢性呼吸衰竭、死亡。中间型临床表现与经典型相同、但症状较轻, 可以在新生儿期出现尿枫糖浆味和轻微症状, 也可以由其他疾病诱发。间歇型常在应激情况下而诱发, 发作时临床表现与经典型相似。维生素 B₁ 反应型症状较轻, 对维生素 B₁ 治疗有反应。二氢脂酰脱氢酶缺乏型患儿出生时表现正常, 可引起新生儿期酸中毒、肌张力低下、进行性共济失调和严重的神经受损症状和体征, 多在儿童期死亡。MSUD 患儿体内的 BCAA 如亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸蓄积, 对脑组织产生神经毒性而导致脑白质病变, 颅脑 MRI 影像表现为脑发育不良、脑皮质较薄、脑室三角区白质信号异常, 在新生儿期起病者头颅 MRI 会呈特异性脑水肿表现^[4], 对疑诊患者尽早行 MRI 检查有助于早期诊断。

质谱分析技术是疾病筛查及确诊的有效手段, 为早期发现新生儿代谢性疾病提供了有效的检测手段^[5]。MSUD 患者血 BCAA 水平明显增高, 而经典型患儿血亮氨酸水平明显增高。通过串联质谱方法检测血滤纸片中氨基酸水平可早期筛查 MSUD^[6]; 而 BCKA 可从尿及体液中排出, 使尿 2-羟基异戊酸、2-酮异戊酸、2-酮-3-甲基戊酸、2-酮-异己酸及乙酰甘氨酸显著高, 通过气相色谱-质谱技术 (GCMS) 检测尿有机酸, 如显著升高即可诊断为 MSUD^[7]。该家系第 1 胎生后 7d 出现拒乳、嗜睡、惊厥, 串联质谱检测显示亮氨酸及缬氨酸显著升高, 提示枫糖尿病。该双胞胎患儿亦在出生后 7~8d 出现拒乳、喂养困难、反应差, 尿液枫糖浆气味, 代谢性酸中毒, 尿酮体阳性, 颅脑 MRI 示脑白质病变、提示代谢性疾病, 血串联质谱检测显示亮氨酸、缬氨酸均显著升高, 故临床诊断为 MSUD。

MSUD 是一种常染色体隐性遗传病, 患者的

父母往往均携带致病的突变基因, 他们的子女有 25% 的可能成为患者。BCKDH 属线粒体大分子多酶复合物, 含 3 个催化单位 (4 个蛋白质分子): 支链 α -酮酸脱羧酶 (E1)、双氢脂酰转环酶 (E2)、二氢脂酰胺脱氢酶 (E3), 其中 E1 是一个杂四聚体, 由 2 个亚单位 E1 α 和 E1 β 亚基组成。此外, BCKDH 复合物两个特殊调节酶, 特异性激酶和特异性磷酸酶, 通过可逆性磷酸化调节 BCKD 复合物活性。这样至少有 6 个遗传位点编码, 任何位点的编码基因都可能发生突变导致 BCKD 多酶复合体活性减低, 从而导致 MSUD 的发生^[8]。根据基因突变将枫糖尿病分为: I A 型 (编码 E1 α 亚基的 BCKDHA 基因突)、I B 型 (编码 E1 β 亚基的 BCKDHB 基因突变)、II 型 (编码 E2 亚基的 DBT 基因突变)、III 型 (编码 E3 亚基的 DLD 基因突变), IV 和 V 则被保留作为特异性激酶和磷酸酶基因突变型^[9]。迄今已在 BCKDH 上发现了 150 多种突变^[10], 以 BCKDHA、BCKDHB 基因突变最常见, 且不同种族存在不同的热点突变, 发病率最高的门诺派教徒社区最常见的突变为 BCKDHA 基因 c.1312T>A (p.Y393N), 该突变预计携带率高达 10%^[11]。国内沈云琳等^[3]报道了 1 例经典型 MSUD 患儿的 2 个新 BCKDHB 基因突变: c.580C>T (p.Leu194Phe) 和 c.597T>G (p.Ser199Arg)。本研究双胞胎患儿在 BCKDHB 基因上均发现 2 个杂合突变: c.304G>A (p.Gly102Arg) 和 c.331C>T (p.Arg111*), 其中 c.304G>A (p.Gly102Arg) 为错义突变, 来自于患儿父亲, 翻译产物蛋白质的第 102 位氨基酸由甘氨酸转变为精氨酸, 经初步生物信息学分析 (LRT、PolyPhen-2) 显示 Gly102 位点在进化上保守、可能致病, 但生物信息学分析结果仅供参考^[12]; c.331C>T (p.Arg111*) 为无义突变, 来自于患儿母亲, 翻译产物蛋白质的第 111 位氨基酸残基由精氨酸变为终止密码子, 该突变预计会导致所编码的蛋白质发生截短, 使 E1 β 亚基发生空间构象变化、氨基酸酸碱度变化等诸多改变, 进而影响脱氢酶的活性, 从而致病, 有文献报道为致病突变^[13]。本研究结果显示, 双胞胎患儿基因突变存在于 BCKDHB 基因上, 确诊为 MSUD I B 型。

本病目前尚无特异而有效的治疗措施, 治疗目的在于迅速排出体内的支链氨基酸及代谢产物,

中枢神经系统受损的程度取决于治疗是否及时^[14]。经典型 MSUD 最佳治疗时机是出生 7d 以内, 早期治疗者 1/3 的患儿智力评分可达正常, 而出生 14d 以后开始治疗者预后差^[15]。腹膜透析是有效的治疗方法, 同时限制蛋白和支链氨基酸入量, 静脉补充足够的热量防止机体分解产生更多的氨基酸, 给予大剂量维生素 B₁ (硫胺素), 采取适量母乳和去除 BCAA 的特殊奶粉混合喂养^[16], 并定期监测血氨基酸浓度以调整饮食的比例。已有在 MSUD 哺乳动物模型中开展肝细胞移植的研究, MSUD 肝脏移植后不需限制饮食, 但受到供体来源、费用、手术风险和并发症的限制, 肝细胞移植则较好地克服了以上缺点^[17]。该双胎患儿明确诊断后立即给予特殊配方奶粉、同时给予维生素 B₁ 治疗, 但患儿家长要求放弃治疗, 放弃后死亡。

MSUD 是致死、致残的遗传性疾病, 治疗困难, 预后不良。患者多在新生儿期发病, 病情危重, 早期诊断、尽早进行饮食和治疗干预对治疗至关重要。对于新生儿期不明原因的喂养困难、嗜睡、反应差、惊厥、甚至昏迷以及有异常尿液气味等, 应尽早行颅脑 MRI 检查, 进行血串联质谱的筛查有利于 MSUD 的早期诊断; 对 MSUD 患者进行基因诊断, 可以预测疾病的严重程度, 有助于开展遗传咨询工作。

[参 考 文 献]

- [1] Menkes JH, Horst PL, Craig JM. A new syndrome: progressive familial infantile cerebral dysfunction associated with an unusual urinary substance[J]. *Pediatrics*, 1954, 14(5): 462-467.
- [2] Strauss KA, Mazariegos GV, Sindhi R. Elective liver transplantation for the treatment of classical maple syrup urine disease[J]. *Am J Transplant*, 2006, 6(3): 557-564.
- [3] 沈云琳, 龚小慧, 颜景斌, 等. 新生儿枫糖尿症一例及其基因突变分析[J]. *中华儿科杂志*, 2015, 53(1): 66-70.
- [4] Sato T, Muroya K, Hanakawa J, et al. Neonatal case of classic maple syrup urine disease: Usefulness of 1H-MRS in early diagnosis[J]. *Pediatr Int*, 2014, 56(1): 112-115.
- [5] Lavin LR, Higby N, Abramo T. Newborn screening: What does the emergency physician need to know[J]. *Pediatr Emerg Care*, 2015, 31(9): 661-667.
- [6] Burrage LC, Nagamani SC, Campeau PM, et al. Branched-chain amino acid metabolism: from rare Mendelian diseases to more common disorders[J]. *Hum Mol Genet*, 2014, 23(R1): R1-8.
- [7] Alodaib A, Carpenter K, Wiley V, et al. An improved ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of alloisoleucine and branched chain amino acids in dried blood samples[J]. *Ann Clin Biochem*, 2011, 48 (Pt5): 468-470.
- [8] Skvorak KJ. Animal models of maple syrup urine disease[J]. *J Inherit Metab Dis*, 2009, 32(2): 229-246.
- [9] Mitsubuchi H, Nobukuni Y, Hayashida Y, et al. Gene analysis of maple syrup urine disease(MSUD)[J]. *Rinsho Byori*, 1993, 41(5): 484-491.
- [10] Fernández-Guerra P, Navarrete R, Weisiger K, et al. Functional characterization of the novel intronic nucleotide change c.288+9C>T within the BCKDHA gene: understanding a variant presentation of maple syrup urine disease[J]. *J Inherit Metab Dis*, 2010, 33(Suppl 3): S191-198.
- [11] Puffenberger EG. Genetic heritage of the old order mennonites of southeastern Pennsylvania[J]. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 2003, 121C(1): 18-31.
- [12] Scaini G, Jeremias IC, Morais MO, et al. DNA damage in an animal model of maple syrup urine disease[J]. *Mol Genet Metab*, 2012, 106(2): 169-174.
- [13] Flaschker N, Feyen O, Fend S, et al. Description of the mutations in 15 subjects with variant forms of maple syrup urine disease[J]. *J Inherit Metab Dis*, 2007, 30(6): 903-909.
- [14] 蒋丰智, 崔其亮, 江剑辉. 家族性枫糖尿症 1 例临床诊治体会[J]. *中国当代儿科杂志*, 2009, 11(7): 599-600.
- [15] Páez Rojas PL, Suarez Obando F. Genetic and metabolic urgencies in the neonatal intensive care unit: maple syrup urine disease[J]. *Nutr Hosp*, 2015, 32(1): 420-425.
- [16] Simon E, Wendel U, Schadewaldt P. Maple syrup urine disease-treatment and outcome in patients of Turkish descent in Germany[J]. *Turk J Pediatr*, 2005, 47(1): 8-13.
- [17] Skvorak KJ, Paul HS, Dorko K, et al. Hepatocyte transplantation improves phenotype and extends survival in a murine model of intermediate maple syrup urine disease[J]. *Mol Ther*, 2009, 17(7): 1266-1273.

(本文编辑: 俞燕)